

200736010B

別添 1 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質感受性の個人差を決定する遺伝子的
要因の検索とその作用機構解析

(H17-化学-010)

平成17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 永沼 章

平成 20 (2008) 年 4 月

目 次

1. 総合研究報告	
化学物質感受性の個人差を決定する遺伝子的要因の検索とその作用機構解析	1
永沼 章	
II. 資 料	
[平成17年度]	
1. siRNAライブラリーを用いたメチル水銀感受性決定因子の網羅的検索法の樹立	19
黄 基旭、永沼 章	
2. siRNA導入細胞ライブラリーを用いたメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子検索	33
黄 基旭	
3. Eno2 ノックダウンによるメチル水銀耐性獲得機構の解析	45
黄 基旭	
4. IMR-32細胞でのメチル水銀に対する遺伝子発現のプロファイリング	49
黄 基旭	
5. 酵母を用いた化学物質感受性の個人差決定に関わる遺伝子の検索方法の樹立 とその応用	77
久下周佐	
6. ヒ素感受性に影響を与える遺伝子群の検索とその作用機構解析	101
大橋一品	

[平成18年度]

7. siRNAライブラリーを用いた化学物質に対する感受性決定因子の網羅的検索 (1)	167
黄 基旭、永沼 章	
8. siRNAライブラリーを用いた化学物質に対する感受性決定因子の網羅的検索 (2)	199
黄 基旭	
9. cDNAライブラリーを用いた化学物質に対する感受性決定因子検索方法の樹立	215
永沼 章	
10. ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強機構の解析	229
黄 基旭	
11. PIGBノックダウンによるメチル水銀耐性獲得機構の解析	261
黄 基旭	
12. Slg1欠損が酵母に与える亜ヒ酸高感受性機構の解析	287
黄 基旭、久下周佐	
13. Akl1の高発現が酵母に与えるアドリアマイシン耐性機構の解析	311
久下周佐	

[平成19年度]

14. siRNAライブラリーを用いたメチル水銀に対する感受性決定因子の網羅的検索	325
黄 基旭、永沼 章	

15. AMP-activated protein kinase (AMPK) の触媒サブユニットPRKAA1の欠損によるメチル水銀耐性獲得機構	341
黄 基旭	
16. メチル水銀毒性を増強する因子Whi2の作用機構	381
黄 基旭	
17. 細胞内蛋白質輸送システムによるメチル水銀毒性増強機構	417
黄 基旭	
18. Protein phosphatase type 1の機能低下による亜ヒ酸毒性増強機構	453
久下周佐	
19. アドリアマイシン毒性の発現における脱ユビキチン化酵素の役割	481
久下周佐	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	495
IV. 研究成果の刊行物・印刷物	499

1. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（総合）研究報告書

生活環境中微量化学物質に対する感受性決定に関する遺伝子群の解明

主任研究者 永沼 章 東北大学大学院薬学研究科教授

本研究の目的は、健康影響が懸念されている化学物質に対する感受性の決定に関与する遺伝子を網羅的に検索・同定する方法を確立し、同定された遺伝子の作用機構を明らかにすることである。本研究によって、siRNA発現プラスミドライブラリーを用いて、ノックダウンすることによってメチル水銀に対するHEK293細胞（ヒト由来細胞）の感受性に影響を与えるヒト遺伝子群を検索する方法が確立された。また、高発現によって細胞の化学物質感受性に影響を与えるヒト遺伝子の検索法も樹立しさらに、ヒト細胞を用いる方法に比べて簡便で信頼性の高い検索方法として、遺伝子欠損酵母を用いた検索方法も樹立した。これらの方法を用いた検索によって、メチル水銀、亜ヒ酸およびアドリアマイシンの毒性に影響を与える遺伝群を数多く同定することに成功した。本研究で同定された遺伝子群はそのほとんどが初めて化学物質感受性に関与することが判明したものであり、この事実は本研究で開発された遺伝子検索法の有用性を明確に示している。本研究によって同定された遺伝子の一部については作用機構解析を行い、興味深い新知見が多数得られたことから、本研究の成果は、今後の化学物質毒性に関する研究の進展にも大きく貢献するものと期待される

分担研究者

久下周佐

（東北大学大学院薬学研究科・准教授）

黄 基旭

（東北大学大学院薬学研究科・助教）

大橋一晶（平成17年度のみ）

（東北大学大学院薬学研究科・助手）

A. 研究目的

遺伝的ハイリスクグループと呼ばれる化学物質に対する感受性が遺伝的に高い人々の存在が示唆されており、これらの人々は比較的少量の化学物質摂取によって健康に障害が生じると考えられる。原因不明とされている疾病の中に、化学物質が高感受性個体に引き起こした症例

が含まれている可能性も否定できない。化学物質に対して遺伝的に高感受性を示す人々の特定は、化学物質による健康被害を最小限に抑えるためにも、また、より正確なリスク評価を行う上でも極めて重要な厚生労働行政課題と考えられる。しかしながら、感受性の個体差に関わる遺伝子が解明されている化学物質はほとんど存在しない。我々はこれまで、哺乳動物に先駆けて全遺伝子配列が決定された酵母を真核細胞生物のモデルとして用い、無作為かつ網羅的な遺伝子スクリーニング法を種々開発して感受性決定遺伝子の同定に挑んできた。酵母の遺伝子の多くはヒトにも類似のものが存在するため、この方法によっていくつかの新規ヒト感受性決定遺伝子の同定に成功したが、本法では酵母で得られた知見をヒト培養細胞で確認する作業に多くの時間が費やされた。

この問題を解決するために、本研究では、最近急速な発展を遂げたsiRNA法を利用し、欠損することによって培養細胞の化学物質感受性に影響を与えるヒト遺伝子群を検索する方法を新たに開発することを第一の目的とする。この方法は、主要なヒト遺伝子をsiRNAライブラリーを用いて一つずつノックダウンするという画期的な手法を取り入れたものであり、この検索方法を用いればヒトの遺伝子を直接同定することができるばかりでなく、対象となる化学物質に対する感受性決定

遺伝子群のほとんどが一気に同定されるので、その化学物質の毒性の発現度を調節する細胞内機構の全容解明も夢ではない。本研究では最終的に、siRNAライブラリーを利用した遺伝子ノックダウン法により、代表的な化学物質に対する感受性決定に関与するヒト遺伝子群を網羅的に同定し、それらの作用機構解明をめざす。さらに本研究では、酵母を用いた信頼性の高い機能遺伝子検索法による感受性決定遺伝子の検索も行う。本研究によって、目的とする遺伝子群が非常に効率良く同定されるものと期待され、得られる成果はこれまで世界中の研究者が集積してきた知見をも凌駕する極めて画期的なものとなり、化学物質に対する遺伝的ハイリスクグループの同定やこれを考慮したリスク評価の実現化、さらには中毒治療法の開発などに大きく貢献することになる。

B. 研究方法

ヒトsiRNAライブラリーを用い、ノックダウンによってHEK293細胞の化学物質感受性に影響を与える遺伝子群を検索した。また、酵母を用いて、欠損によって化学物質感受性に影響を与える遺伝子の検索も行った。検索で得られた遺伝子の一部については、その作用機構を様々な生化学的手法を用いた解析により検討した。

(倫理面への配慮)

倫理面での配慮が必要な実験は含まれ

ていない。なお、遺伝子組み換え実験は、所属長の承認を得て、指定実験室で作業を行った。

C. 研究結果

1. 化学物質感受性決定遺伝子の網羅的検索法の樹立

1-1. siRNAライブラリーを用いた化学物質感受性決定に関わるヒト遺伝子の網羅的検索法の樹立

平成17年度に、ヒト遺伝子のうち機能の判明している約8,500の遺伝子に対応するsiRNA発現プラスミドライブラリーをレンチウイルス感染法を用いてヒト胎児腎由来培養細胞（HEK293細胞）に導入して各遺伝子をそれぞれノックダウンするという方法で、化学物質感受性に影響を与える遺伝子をスクリーニングする基本的な方法を確立した。本法は、化学物質処理した際の、各siRNA導入細胞の存在割合をDNAマイクロアレイで解析することによって、細胞をメチル水銀耐性または高感受性にするsiRNAを検索するものであり、理論的に優れた方法である。平成18年度には更に本法を改良し、ヒトの全遺伝子をほとんど網羅する約50,000の遺伝子をそれぞれノックダウンさせるスクリーニング法を確立した。本法によって、GPIアンカー合成に関わるPIGB、ピルビン酸合成に関わるENO2、および細胞のエネルギー制御や代謝に関わるAMP-activated protein kinase (AMPK)

の触媒サブユニットであるPRKAA1などの遺伝子がノックダウンによってHEK293細胞にメチル水銀耐性または高感受性を与えることが判明した。しかし、本法は1回のスクリーニングにかかる費用が400万円と高額であることが問題となることから、より低費用で実施可能なシステムの構築も行い、1/4以下の費用で実施可能な独自システムの開発にも成功した。ただし、本検索系は導入したsiRNAライブラリーの発現レベルがあまり高くなく、一次スクリーニングにおいてはメチル水銀毒性に実際は関与しない遺伝子も選択された。そこで、この問題を解決するために、平成19年度には、siRNA発現プラスミドではなく、合成siRNA断片そのもの（17,000種のヒト遺伝子に対応するsiRNAを準備した）を1つずつ細胞内に確実に導入する方法も確立し、発現抑制によって細胞にメチル水銀高感受性を与える遺伝子として10種、逆に、発現抑制によって細胞にメチル水銀耐性を与える遺伝子として13種の遺伝子を同定することに成功した。本法はより確実性の高い、優れたスクリーニング方法であると考えられる。

1-2. 高発現によって感受性に影響を与えるヒト遺伝子検索法の確立

遺伝子を安定発現させることが可能なFIP-INシステムを利用してヒトcDNAライブラリーをヒト由来培養細胞中に高発現させ、この細胞群を用いて高発現によっ

て化学物質感受性に影響を与える遺伝子の検索法を確立した。本法を用いた検索によって、GDP/GTP交換反応抑制因子であるGDI2がHEK293細胞を亜硫酸耐性にする遺伝子として同定された。

1-3. 酵母を用いた化学物質感受性の決定に関わる遺伝子検索法の確立

酵母はヒト細胞よりも効率良く目的とする遺伝子を検索できという利点を有することから、簡便で信頼性の高い検索法の樹立を試みた。その結果、欠損によって細胞の化学物質に対する感受性を高める遺伝子と低下させる遺伝子を同時に効率良く検索する方法を樹立することに成功した。本法によって、特に強い細胞毒性を示すモデル毒物として選択したアドリアマイシンに対して耐性を与える遺伝子を152種、高感受性を与える遺伝子を254種、また、亜硫酸に対して耐性を与える遺伝子59種、高感受性を与える遺伝子83種を同定することに成功した。

2. メチル水銀感受性に関わる遺伝子の作用機構解析

2-1. Eno2ノックダウンによるメチル水銀耐性獲得機構の解析

siRNAライブラリーを用いた検索によって、ピルビン酸合成に関わる酵素Eno2のノックダウンがヒト培養細胞をメチル水銀耐性にすることが判明したことから、ピルビン酸とメチル水銀毒性との関係を検討した。その結果、ヒト脳由来細胞で

あるIMR32のメチル水銀感受性をピルビン酸（培地に添加）が顕著に増強させ、さらに、メチル水銀がミトコンドリア中のピルビン酸の取り込みを促進させることが判明した。また、ミトコンドリア中に蓄積したピルビン酸がアセチルCoAへの変換およびそれに続くTCAサイクルでの代謝を受けることなくメチル水銀毒性を増強することが明らかとなり、ピルビン酸によるTCAサイクル非依存的なメチル水銀毒性増強機構の存在が示唆された。ミトコンドリアの電子伝達系に関わる様々な因子の欠損がメチル水銀感受性に与える影響を酵母を用いて検討したところ、complex IIIの構成因子の1つであるRip1のみが欠損によって酵母をメチル水銀耐性にした。Rip1欠損酵母では、野生型酵母で認められるピルビン酸によるメチル水銀毒性増強がほとんど認められないことから、ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強にRip1が強く関わっていると考えられる。

2-2. PIGBノックダウンによるメチル水銀耐性獲得機構の解析

Eno2と同様にノックダウンによってヒト由来HEK293細胞をメチル水銀耐性にすることが判明した蛋白質にPIGB (phosphatidylinositol glycan class B) がある。PIGBは、ある種の蛋白質が細胞膜などに結合するために必要なGPIアンカーを小胞体膜上で合成する酵素の一つ

である。PIGBと同様にGPIアンカーの合成に関わる因子であるPIGVのsiRNAを導入した細胞を作製したところ、PIGB siRNA導入細胞と同様に対照細胞に比べて高いメチル水銀耐性が認められ、GPIアンカーの合成の抑制がメチル水銀毒性軽減に関与していることが初めて示唆された。また、初期のGPIアンカーの形成に関わるceramideを培地中に添加しても、HEK293細胞のメチル水銀感受性はほとんど影響を受けなかったが、神経芽細胞腫由来のSH-SY5Y細胞に添加したところ、細胞毒性を示さない濃度のceramide存在下でメチル水銀毒性の増強が認められた。Ceramideの添加は、神経細胞特異的にGPIアンカーの合成を亢進させてメチル水銀毒性を増強する可能性が考えられる。

2-3. AMP-activated protein kinase (AMPK)の触媒サブユニット PRKAA1の欠損によるメチル水銀耐性獲得機構

ヒト遺伝子転写産物を標的としたsiRNAライブラリーを用いた検索において、発現抑制によって細胞をメチル水銀高感受性にする遺伝子としてPRKAA1が同定された。PRKAA1は、細胞のエネルギー制御や代謝に関わるAMP-activated protein kinase (AMPK)の触媒サブユニットである。AMPKはキナーゼ活性を有し、グルコース飢餓などのストレスにより活性化されることが知られている。PRKAA1の発現抑制によるメチル水銀感受性の上昇の程度は高グルコース存在下の方が顕

著であり、PRKAA1のアイソフォームであるPRKAA2のsiRNAを導入した細胞では、PRKAA1のsiRNA導入細胞で観察されたようなメチル水銀感受性の増強は認められなかった。AMPKの活性化に関わるキナーゼとしてLKB1やCaMKK β が報告されているが、細胞のメチル水銀に対する感受性はLKB1の発現抑制によってのみ増強され、その程度は高グルコース存在下の方が高かった。一方、活性化されたAMPKを脱リン酸化して不活性化させる因子として知られているprotein phosphatase 2C (PP2C)の発現抑制の効果は僅かであったが、高グルコース存在下では非常に強い耐性を与え、PP2Cがメチル水銀毒性を増強させる働きを有することが示唆された。

2-4. メチル水銀毒性を増強する因子 Whi2の作用機構

我々は、細胞内での蛋白質分解システムの一つである、ユビキチン・プロテアソームシステムにおいてユビキチン転移酵素として機能するCdc34の高発現が酵母およびヒト細胞にメチル水銀耐性を与えることを見出し、細胞内に存在するメチル水銀毒性増強蛋白質のユビキチン・プロテアソームシステムによる分解の促進によってメチル水銀毒性が軽減されることを明らかにしている。このメチル水銀毒性を増強させる蛋白質を同定することによって、メチル水銀毒性の発現機構を解明するうえでの重要な手掛かりが得ら

れるものと思われる。そこで酵母遺伝子欠損株ライブラリーを用いてユビキチン・プロテアソームシステムによって分解されるメチル水銀毒性増強蛋白質の検索を行ったところ、Hom3 および Whi2 を同定することに成功し、そのうち、Whi2 が Cdc34 依存的にユビキチン化された後にプロテアソームで分解される可能性が示された。Whi2 と結合することが報告されている蛋白質の中で、Akr1 が欠損によって酵母にメチル水銀高感受性を与えることが判明し、Whi2 は Akr1 が示すメチル水銀毒性軽減作用を阻害している可能性を示唆する結果が得られた。正常酵母で認められる Cdc34 高発現によるメチル水銀耐性獲得が Akr1 の欠損によって認められなくなったことから、Cdc34 高発現による酵母のメチル水銀耐性獲得機構には Akr1 が必要であり、Cdc34 が高発現すると Whi2 の細胞レベルが減少し、Whi2 による Akr1 の活性抑制の程度が低下するために、Akr1 のメチル水銀毒性軽減作用が十分に発揮されるようになると考えられる。Akr1 によるメチル水銀毒性軽減には Akr1 が有するパルミトイルトランスフェラーゼ活性が必須であることも判明したことから、Akr1 の基質を検索したところ、Yck1 および Yck2 を同時に欠損した酵母が Akr1 を欠損した酵母と同程度の高いメチル水銀感受性を示し、この二重欠損酵母に Cdc34 を高発現させてもメチル水銀耐性は認められなかった。以

上の結果から、Cdc34 の高発現は Yck1 および Yck2 が関与するシグナル伝達を亢進させることによってメチル水銀毒性を軽減している可能性が考えられる。

2-5. 細胞内蛋白質輸送システムによるメチル水銀毒性増強機構

欠損によって酵母のメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子の検索を行い、合計 50 種を同定することに成功した。この中には、酵母細胞内における液胞への蛋白質輸送に関わる因子をコードする遺伝子が 7 種含まれていた。そこで、液胞への蛋白質輸送に関わるということが知られている各因子とメチル水銀毒性との関係を検討した。その結果、ゴルジ体からエンドソームを介した液胞への一連の蛋白質輸送経路がメチル水銀毒性増強に深く関与していることが判明した。エンドソーム内に取り込まれる蛋白質はまず、細胞質中でモノユビキチン化（一つのユビキチンと結合）され、これがシグナルとなってエンドソーム膜上に存在する Vps27-Hse1 複合体により認識される。そこで、Vps27 または Hse1 と結合することが報告されている蛋白質の中からメチル水銀毒性を増強する蛋白質を検索したところ、Ynr005c（機能未知）および Ubi4（ポリユビキチン）が見出された。Ynr005c は細胞内でユビキチン化を受けることが確認された。一方、Ubi4 の発現は通常状態においては非常に低く、heat shock などのストレスによって誘導され

て様々なストレスに対して防御的に働くことが知られている。本研究においても、メチル水銀によってUbi4の発現が誘導されることが確認された。メチル水銀はこのUbi4の発現を誘導することによって、ある種の蛋白質のモノユビキチン化を介したエンドソーム内への取り込みを亢進し、その結果としてメチル水銀の細胞毒性が引き起こされている可能性も考えられる。

3. 亜ヒ酸感受性に関わる遺伝子の作用機構解析

3-1. 細胞骨格関連因子と亜ヒ酸毒性の関係

1-3で、亜ヒ酸感受性に影響を及ぼす遺伝子が同定された。我々は以前に、酵母を用いてヒ素感受性に影響を与える遺伝子群の検索を行っているが、ここで見出された遺伝子の9割以上は前回見逃された新規のものであった。その中には、細胞骨格の形成や機能調節に関与する因子群、蛋白質の細胞内輸送に関与する因子群および蛋白質合成に関与する因子群がそれぞれ比較的多数同定された。細胞骨格に関連する因子が多数得られたことから、酵母を亜ヒ酸処理した際のアクチンの挙動を観察したところ、アクチンの斑点状の点在が同様に観察され、ヒ素毒性に対する防御機構としてアクチンの重合など細胞骨格の機能・制御が重要な役割を果たしている可能性が新しく示唆さ

れた。

3-2. Slg1欠損が酵母に与える亜ヒ酸高感受性機構の解析

酵母を用いたスクリーニング(1-3)によって細胞骨格の機能や制御に関与する遺伝子の欠損が酵母を亜ヒ酸高感受性にすることが判明した。酵母には各種のストレスに応答して細胞骨格の制御を行うPkc1-MAPK経路が存在するが、この経路に関与する遺伝子の多くも欠損によって酵母を亜ヒ酸高感受性にした。そこで、Pkc1-MAPK経路の上流に位置する数種の膜受容体について検討したところ、ストレス感知を担う膜受容体であるSlg1の欠損が酵母を亜ヒ酸高感受性にし、逆に高発現は亜ヒ酸耐性にすることが判明した。Slg1の構造中でC末領域が高発現による亜ヒ酸耐性に必要であり、この領域に結合する下流因子であるRom2の欠損も酵母を亜ヒ酸高感受性にする事が明らかとなった。また、亜ヒ酸処理によってSlg1の蛋白質レベルが顕著に減少することも判明し、この現象が亜ヒ酸毒性の増強に関わることが示唆された。さらに、酵母Slg1のヒトホモログであるCD43を高発現させたヒト培養細胞が亜ヒ酸に耐性を示すことも明らかとなった。

3-3. Protein phosphatase type 1の機能低下による亜ヒ酸毒性増強機構：

酵母を用いたスクリーニング(1-

3) によって、欠損により出芽酵母の亜ヒ酸に対する感受性を増強させる細胞内因子として Reg1 が同定された。Reg1 はホスファターゼ活性を持つ Glc7 と protein phosphatase type 1 (PP1) complex を形成しており、Reg1 欠損により PP1 complex の活性が低下することが知られている。PP1 complex は出芽酵母の糖代謝を司る Ser/Thr キナーゼである Snf1 kinase complex の脱リン酸化を促進することによって、その kinase 活性を抑制する。Snf1 高発現が酵母の亜ヒ酸感受性に与える影響を検討したところ、Snf1 高発現によって酵母が亜ヒ酸に対して高い感受性を示すことが明らかになった。また、Reg1 欠損による亜ヒ酸毒性増強作用が Snf1 同時欠損により軽減され、Reg1 欠損による亜ヒ酸毒性増強に Snf1 kinase complex が深く関与していることが示唆された。Snf1 kinase complex が有するキナーゼ活性が亜ヒ酸毒性増強に必要であることも確認された。また、Reg1 欠損により Snf1 のリン酸化の亢進が認められたことから、Reg1 欠損による亜ヒ酸毒性増強は Snf1 kinase complex のキナーゼ活性の過剰な亢進による可能性が示唆された。また、Snf1 kinase complex の下流因子の中で、Mig1 の欠損が酵母の亜ヒ酸感受性を上昇させることが明らかとなった。Mig1 は、Snf1 kinase complex によるリン酸化によってその活性が抑制される転写因子である。Reg1 欠損酵母の Mig1 をさらに欠損させても、Reg1 欠損酵母の亜ヒ酸感受性はほとん

ど影響を受けなかったことから、Mig1 と Reg1 の欠損は同一の経路を介して亜ヒ酸の毒性を増強していると考えられる。また、Mig1 の高発現酵母は亜ヒ酸耐性を示したが、Reg1 欠損酵母に Mig1 を高発現させた場合には Mig1 高発現による亜ヒ酸耐性はほとんど認められなかった。Reg1 欠損酵母では、Snf1 kinase complex のキナーゼ活性が亢進しており、Mig1 の活性が抑制されているため、Mig1 高発現による亜ヒ酸耐性が認められないと考えられる。さらに、ヒト細胞において、PP1 の阻害剤である tautomycin が亜ヒ酸感受性を増大させることが明らかとなった。したがって、酵母細胞のみならずヒト細胞においても PP1 complex が亜ヒ酸発現機構に関与している可能性が考えられる。

4. アドリアマイシン感受性に関わる遺伝子の作用機構解析

本研究の対象化学物質の一つとして、強い細胞毒性を示すことが知られているアドリアマイシンを選択した。アドリアマイシンは環境化学物質ではないが、より細胞毒性の強い物質を対象とした方が、検索方法の検討には適していると判断したからである。

4-1. Ak11の高発現が酵母に与えるアドリアマイシン耐性機構の解析

1-3 で実施したスクリーニングによってエンドサイトーシスに関わるいくつかの因子の欠損が酵母をアドリアマイシ

ンに対して高感受性にすることが判明した。Ak11はその機能についての報告はほとんどないが、配列上の特徴からエンドサイトーシスなどの制御に参与するArk/Prk kinase familyの一つと考えられている。そこで、Ak11とアドリアマイシン感受性との関係を検討した。Ark/Prk kinase family (Ark1, Prk1およびAk11)の中ではAk11以外に、Prk1が高発現によって酵母にアドリアマイシン耐性を与えた。Prk1はエンドサイトーシスに関わる Sla1/Pan1/End3 complex中のSla1およびPan1をリン酸化して本complexの解離を促すことが知られている。本研究によって、Ak11が、Prk1と同様に、Sla1/Pan1/End3 complex中のPan1のリン酸化を促進し、細胞のエンドサイトーシス能の低下を引き起こすことが判明した。また、Sla1またはEnd3を欠損させた酵母もそれぞれアドリアマイシン耐性を示し、両欠損酵母にAk11を高発現させてもアドリアマイシン耐性度の上昇は認められなかった。したがって、Ak11はPan1をリン酸化することによってSla1/Pan1/End3 complexが関与する細胞のエンドサイトーシス能を低下させることでアドリアマイシン毒性を軽減していると考えられる。また、ヒトArk/Prk kinase familyの一員であるAAK1を高発現させたHEK293細胞がアドリアマイシン耐性を示すことも判明した。

4-2. アドリアマイシン毒性の発現における脱ユビキチン化酵素の役割

1-3で実施したスクリーニングによって、欠損によって酵母にアドリアマイシン耐性を与える細胞内因子として三種の脱ユビキチン化酵素(Ubp2, Ubp6, Ubp14)が同定された。そこで、アドリアマイシン耐性と脱ユビキチン化酵素の関係について検討した。出芽酵母に存在する17種類の脱ユビキチン化酵素をそれぞれ欠損させた酵母のアドリアマイシン感受性を調べた結果、スクリーニングによって同定されているUbp2, Ubp6, Ubp14に加えて、Ubp4の欠損も酵母にアドリアマイシン耐性を与えることが明らかとなった。一方、欠損によりアドリアマイシン毒性を増強させる脱ユビキチン化酵素としてUbp3, Ubp7, Ubp13が同定された。欠損により酵母にアドリアマイシン耐性を与える各脱ユビキチン化酵素(Ubp2, Ubp6, Ubp4 および Ubp14)を二種類同時に欠損させた酵母(*ubp2 Δ ubp4 Δ*, *ubp2 Δ ubp6 Δ*, *ubp4 Δ ubp14 Δ*)のアドリアマイシン感受性を検討したところ、各二重欠損酵母はそれぞれの単独欠損酵母と比べ、相加的なアドリアマイシン耐性の増強を示した。したがって、これらの脱ユビキチン化酵素は、それぞれ異なる経路を介してアドリアマイシン毒性に関与している可能性が考えられる。脱ユビキチン化酵素の欠損によって、細胞内ユビキチン量が低下することが報告されているが、脱ユビキチン化酵素欠損酵母(*ubp2 Δ*, *ubp6 Δ*)にポリユビキチンUbi4

を高発現させてもアドリアマイシン感受性に変化がなかったことから、Ubp2の欠損およびUbp6の欠損によるアドリアマイシン耐性獲得には、細胞内ユビキチン量の低下は関与しないと考えられる。さらに、脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得には既知のアドリアマイシン耐性獲得機構である細胞内抗酸化機構の亢進やアドリアマイシンの細胞外への排出の促進は関与していないことから、脱ユビキチン化酵素欠損によるアドリアマイシン耐性獲得機構は、これまで知られていない全く新しい耐性獲得機構である可能性が考えられる。

D. 考察

化学物質に対する細胞の感受性に影響を与える遺伝子群を多数同定することができた。同定された遺伝子のほとんどは初めて化学物質毒性に関与することが見出されたものである。本研究によって多くの新しい感受性決定機構も明らかになったことから、本研究成果は感受性決定機構に関する今後の研究の発展にも大きく貢献すると思われる。siRNAを用いたスクリーニングによっても多くの遺伝子を同定することができた。特に、最終年度に開発した合成siRNA断片を細胞内に導入する方法が、最も信頼性が高く効果的と考えられることから、今後は本法を用いることによってさらに効率の良いスクリーニングが可能になるものと期待され

る。

E. 結論

本研究において開発されたスクリーニング法が化学物質に対する感受性の決定に関わる遺伝子（蛋白質）の検索・同定に有用であることが実証された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hwang GW, Sasaki D, Naganuma A, Overexpression of Rad23 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* via inhibition of the degradation of ubiquitinated proteins, *Mol Pharmacol* 2005; 68: 1074-1078.

Hwang GW, Furuoya Y, Hiroshima A, et al., Overexpression of Bop3 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* through interaction with other proteins such as Fkh1, Rts1 and Msn2, *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 378-385.

Takahashi T, Furuchi T, Naganuma A, A novel role for Bsd2 in the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to adriamycin, *J Cell Physiol* 2005; 202: 100-104.

Okazaki S, Naganuma A, Kuge S, Peroxiredoxin-mediated redox regulation of the nuclear localization of Yap1, a transcription factor in budding yeast, *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 327-334.

Miura N, Kanayama Y, Nagai W, et al., Characterization of an immortalized hepatic stellate cell line established from metallothionein-null mice, *J Toxicol Sci* 2006; 31: 391-398.

Kita K, Miura N, Yoshida M, et al., Potential effect on cellular response to cadmium of a single-nucleotide A → G polymorphism in the promoter of the human gene for metallothionein IIA, *Hum Genet* 2006; 120: 553-560.

Kimura A, Ohashi K, Yamamoto R, et al., Cisplatin-induced expression of iron-retaining genes FIT2 and FIT3 in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Toxicol Sci* 2006; 31: 287-290.

Hwang GW, Naganuma A, DNA microarray analysis of transcriptional responses of human neuroblastoma IMR32 cells to methylmercury, *J Toxicol Sci* 2006; 31: 537-538.

Hwang GW, Ishida Y, Naganuma A, Identification of F-box proteins that are involved in resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett* 2006; 580: 6813-6818.

Hwang GW, A ubiquitin-proteasome system as a factor that determine the sensitivity to methylmercury, *Yakugaku Zasshi* 2007; 127: 463-468.

Kimura A, Ohashi K, Naganuma A, Cisplatin upregulates *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in iron homeostasis through activation of the iron insufficiency-responsive transcription factor Aft1, *J Cell Physiol* 2007; 210: 378-384.

Takahashi T, Furuchi T, Naganuma A, Endocytic Ark/Prk kinases play a critical role in adriamycin resistance in both yeast and mammalian cells, *Cancer Res* 2006; 66: 11932-11937.

Hwang GW, Furuchi T, Naganuma A, Ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 mediates cadmium resistance in budding yeast through ubiquitination of the transcription factor Met4. *Biochem*

Biophys Res Commun. 2007; 363: 873-878.

Hwang GW, Hayashi T, Kita K, Takahashi T, Kuge S, Naganuma A, siRNA-mediated inhibition of phosphatidylinositol glycan Class B (PIGB) confers resistance to methylmercury in HEK293 cells. J Toxicol Sci. 2007; 32: 581-583.

Kanda H, Kikushima M, Homma-Takeda S, Sumi D, Endo A, Toyama T, Miura N, Naganuma A, Kumagai Y, Downregulation of arginase II and renal apoptosis by inorganic mercury: overexpression of arginase II reduces its apoptosis. Arch Toxicol. 2007; 82: 67-73.

Tokuda E, Ono S, Ishige K, Naganuma A, Ito Y, Suzuki T, Metallothionein proteins expression, copper and zinc concentrations, and lipid peroxidation level in a rodent model for amyotrophic lateral sclerosis. Toxicology. 2007; 229: 33-41.

2. 学会発表

村井康高、黄 基旭、永沼 章：エンドソームへの蛋白質の取り込みに関わる Vps27-Hsc70 複合体とその結合蛋白質 Ynr005c のメチル水銀毒性発現における

役割. 第 28 回日本分子生物学会年会, 2005.

橋 剛、永沼 章、久下周佐：過酸化水素シグナル感知におけるペルオキシレドキシンの機能解析. 第 28 回日本分子生物学会年会, 2005.

久保田直子、永沼 章、福田隆志、供田洋、久下周佐：HCV コア蛋白質が示す酵母細胞増殖抑制作用における Hsp90 分子種の関わり. 第 28 回日本分子生物学会年会, 2005.

Shoko Okazaki, Akira Naganuma, Shusuke Kuge : Coordinated thiol-disulfide exchange reactions of Yap1 prevent formation of nonspecific mixed disulfide upon oxidative stress. International Redox Network, 2005.

Masataka Nomoto, Naoko Kubota, Akira Naganuma and Shusuke Kuge : Dissection of nuclear import activity of importin Kap121 from its growth defect phenotype. International symposium on life of proteins, 2005.

荻原庸介、黄 基旭、永沼 章：メチル水銀毒性増強蛋白質 Whi2 がパルミトイルトランスフェラーゼ Akr1 の機能に与える影響. フォーラム 2005：衛生薬学・

環境トキシコロジー, 2005.

村井康高、黄 基旭、永沼 章：エンドソーム上に存在する蛋白質選別輸送システムによるメチル水銀毒性の増強機構：基質認識に関わる Vps27 の関与様式. フォーラム 2005：衛生薬学・環境トキシコロジー, 2005.

稲葉佐知子、大橋一品、永沼 章：NADPH oxidase によるパラコート毒性の増強. フォーラム 2005：衛生薬学・環境トキシコロジー, 2005.

廣瀬知子、黄 基旭、永沼 章：酵母 F-box 蛋白質 Ufo1 の高発現によるメチル水銀耐性とその機構解析. 第 44 回日本薬学会東北支部大会, 2005.

荻原庸介、黄 基旭、永沼 章：ユビキチン転移酵素 Cdc34 の高発現によるメチル水銀毒性軽減機構：メチル水銀毒性増強蛋白質 Whi2 の役割. 第 44 回日本薬学会東北支部大会, 2005.

橘 剛、永沼 章、久下周佐：過酸化水素シグナル感知におけるペルオキシレドキシンの機能解析. 第 44 回日本薬学会東北支部大会, 2005.

Yousuke Ogiwara、Gi-Wook Hwang、Akira Naganuma : Fuctional analysis of

proteins that degraded by ubiquitin-proteasome system and involved in enhancement of methylmercury toxicity. 第78回日本生化学大会, 2005.

Sachiko Inaba、Kazuaki Ohashi、Akira Naganuma : Enhancement of paraquat toxicity by membrane-associated reductases. 第 78 回日本生化学大会, 2005.

Shushuke Kuge : Redox shift-mediated transduction of oxidative stress by multiple disulfide formation in Yap1 transcription factor. 2nd International Congress Stress Responses in Biology and medicine, 2005.

黄 基旭：メチル水銀に対する感受性決定要因としてのユビキチン・プロテアソームシステム. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005.

荻原庸介、黄 基旭、永沼 章：ユビキチン・プロテアソームシステムで分解されるメチル水銀毒性増強蛋白質の検索. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005.

村井康高、黄 基旭、永沼 章：メチル

水銀が酵母細胞内の物質輸送に与える影響. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005.

久保田直子、久下周佐: C型肝炎ウイルスコア蛋白質の機能阻害物質の探索. 第 54 回 日本ウイルス学会学術集会, 2006.

吉田敦美、久保田直子、久下周佐: HCV コア蛋白質による細胞機能阻害に必要な領域: 出芽酵母モデルシステムを用いた解析. 第 54 回 日本ウイルス学会学術集会, 2006.

Hwang GW : A ubiquitin-proteasome system as a determination factor involved in methylmercury toxicity. 2006 Fall Symposium of Korean Society of Toxicology (KSOT) and Korean environmental Mutagen Society (KEMS), 2006.

廣瀬健一郎、高橋 勉、永沼 章: 酵母プロテインホスファターゼ Ptc1 欠損によるアドリアマイシン毒性増強機構におけるリボソーム蛋白質 Rpl12a および Rpl12b の関与. フォーラム 2006; 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2006.

丹羽 貴子、黄 基旭、永沼 章: ヒ素耐性因子 Slg1 の作用機構解析. フォーラム 2006 ; 衛生薬学・環境トキシコロジ

ー, 2006.

李 辰竜、黄 基旭、永沼 章: ミトコンドリア内ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強機構. フォーラム 2006 ; 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2006.

林 達也、黄 基旭、永沼 章: メチル水銀毒性に関わるヒト遺伝子の siRNA ライブラリーを用いた検索とその作用機構. フォーラム 2006 ; 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2006.

高橋 勉、永沼 章: Akr/Prk kinases family 高発現によるドキシソルビシン耐性. 第 65 回日本癌学会学術総会, 2006.

松尾拓洋、黄 基旭、中島晶子、永沼章; 酵母のカドミウム感受性に影響を与える因子の同定. 第 45 回日本薬学会東北支部大会, 2006

李 辰竜、黄 基旭、永沼 章; ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強における Rip1 の役割. 第 45 回日本薬学会東北支部大会, 2006

廣瀬健一郎、高橋 勉、永沼 章: 酵母プロテインホスファターゼ Ptc1 欠損によるアドリアマイシン毒性増強機構の解析. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2006.

丹羽貴子、黄 基旭、大橋一晶、永沼章：ヒ素感受性に影響を与える遺伝子群の検索とその作用機構解析. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2006.

黄 基旭、村井康高、永沼 章：出芽酵母でのメチル水銀毒性発現におけるエンドソーム内への蛋白質取り込みシステムの役割. 第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2006.

久下周佐、久保田直子、金澤知博：HSP90 阻害剤による C 型肝炎ウイルスコア蛋白質の機能阻害. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 2007.

高橋 勉、永沼 章：リン酸化を介したエンドサイトーシスの制御システムが関わるアドリアマイシン耐性獲得機構の解析. 第 29 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2007

廣瀬健一郎、高橋 勉、永沼 章：エンドサイトーシス経路に関わる蛋白質群とアドリアマイシン毒性との関係. フォーラム 2006 ; 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2007.

李 辰竜、黄 基旭、永沼 章：メチル水銀がミトコンドリア中のピルビン酸の取り込みに及ぼす影響. フォーラム

2007 ; 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2007.

福光 徹、黄 基旭、荻原庸介、永沼章：パルミトイルトランスフェラーゼ Akr1 によるメチル水銀毒性軽減における Whi2 の関与. フォーラム 2007 ; 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2007.

高橋 勉、永沼 章：出芽酵母における新生ポリペプチド輸送に関わる NAC の機能低下によるドキシソルビシン毒性の増強. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007.

晴山聖子、廣瀬健一郎、高橋 勉、永沼章：酵母におけるアドリアマイシン耐性獲得機構における脱ユビキチン化酵素の関与. 第 46 回日本薬学会東北支部大会, 2007

飛田真由美、黄 基旭、永沼 章：siRNA ライブラリーを用いたメチル水銀感受性決定因子の検索. 第 46 回日本薬学会東北支部大会, 2007

福光 徹、黄 基旭、永沼 章：メチル水銀毒性軽減におけるパルミトイルトランスフェラーゼ Akr1 の役割. 第 46 回日本薬学会東北支部大会, 2007

高橋 勉、永沼 章：酵母の金属トランスポーター Smf2 とアドリアマイシン毒